

# **Kvantitativ RT-PCR-analys för detektion av pigmentrelaterade transkript i hårrötter från hund**

**Ulrika Falkenö**

**Handledare: Henrik von Euler  
Inst. för kliniska vetenskaper, SLU  
Biträdande handledare: Bertil Kågedal  
Avd. för klinisk kemi, Linköpings Universitetssjukhus**



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

ABSTRACT.....	1
SAMMANFATTNING .....	2
FÖRKORTNINGAR .....	3
INLEDNING .....	4
Malignt melanom.....	4
Melanogenes .....	6
Pigmentrelaterade transkript .....	6
Kvantitativ RT-PCR-analys .....	7
Syfte .....	8
MATERIAL OCH METOD .....	8
Homogenisering och RNA-extraktion .....	8
Primrar och prober .....	8
First-strand cDNA-syntes .....	9
PCR.....	9
RESULTAT .....	9
DISKUSSION.....	10
LITTERATURFÖRTECKNING.....	12

## **ABSTRACT**

Malignant melanoma represents 4-7% of all canine neoplasms and they are the most common malignant tumors of the oral cavity and digits. These tumors are often aggressive and metastasize quickly. To date there is no effective treatment and survival times are short. Most dogs are euthanized due to complications caused by metastases. Melanin pigment is a hallmark of melanomas and is usually present in large amounts in these tumors. The aim of this study was to see if quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (QRT-PCR) could be used for detection of pigment related transcripts in canine hair roots. Human primers and probes were used for tyrosinase (TYR) and tyrosinase related protein 1 (TYRP1). For antigen recognized by T cells 1 (Melan-A/MART1) probe and primers had to be redesigned to fit the canine genome. The samples consisted of 30 hair roots each from 18 dogs with different fur colour. Our results show that black hair has a large amount of the pigment related transcripts and that white hair has no or very little TYR and TYRP-1 transcripts. Even brown and yellow hair roots contain no or very little TYR and TYRP-1 transcripts. In the future it would be interesting to analyze the pigment content of canine hair of especially brown and yellow color. If developed for analysis of the pigment related transcripts in tumour and lymphatic tissue as well as in blood this quantitative RT-PCR method could be usable for detection of melanomas, staging of patients and monitoring of therapeutic effect in both humans and dogs.

## **SAMMANFATTNING**

Malignt melanom utgör ca 4-7% av alla tumörer hos hund och de är de vanligaste maligna tumörerna i munhåla och tår. Dessa tumörer är ofta aggressiva och metastaserar snabbt. Det finns idag ingen effektiv behandling och överlevnadstiderna är mycket korta. De flesta hundar avlivs p.g.a. komplikationer orsakade av metastaser. Melaninpigment är ett kännemärke för melanom och förekommer ofta i stor mängd i dessa tumörer. Syftet med den här studien är att se om man kan använda kvantitativ reverse transcriptase-polymerase chain reaction (QRT-PCR) för att detektera pigmentrelaterade transkript i hårrötter från hund. Vi använde oss av humana sekvenser för prober och primrar till tyrosinas (TYR) och tyrosinasrelaterat protein 1 (TYRP1) medan vi fick designa ny probe och primrar till antigen recognized by T cells 1 (Melan-A/MART1). Materialet utgjordes av 30 hårstrån från vardera 18 hundar med olika pälsfärg. Resultaten visar att svarta hundar har höga halter av de pigmentrelaterade transkripten i sina hårrötter medan de vita hundarnas hårrötter inte innehåller några eller mycket få TYR- och TYR-1-transkript. Även de gula och bruna hundarna har inga eller mycket liten mängd TYR- och TYR-1-transkript i sina hårrötter. I framtiden vore det intressant att analysera pigmentinnehållet i hår från hundar med framförallt gul och brun pälsfärg. Om den kvantitativa RT-PCR-metoden utvecklas för analys av pigmentrelaterade transkript i tumör-, lymfvävnad och blod borde den kunna användas för att detektera melanom, avgöra i vilket stadium av sjukdomen patienter befinner sig och även följa terapieffekt hos både hund och människa.

## **FÖRKORTNINGAR**

cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
Melan-A/MART-1	melanoma antigen recognized by T-cells 1
mRNA	messenger ribonucleic acid
PCR	polymerase chain reaction
QRT-PCR	quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
TYR	tyrosinas
TYRP-1	tyrosinasrelaterat protein-1

## INLEDNING

### **Malignt melanom**

Melanom är en cancersjukdom med allvarliga konsekvenser för både människa och hund. Hos hundar upptäcks den vanligtvis sent, när metastasering redan skett, och då kirurgisk behandling inte är botande (MacEwen, 1990; Modiano, 1999; Smith, 2002). Malignt melanom utgör ca 4-7% av alla tumörer hos hund (Hoyt, 1984; Modiano, 1999; Smith, 2002) och är den vanligaste tumörformen i munhålan (MacEwen, 1999; Ramos-Vara, 2000; Ohashi, 2002; Bergman, 2003). Den vanligaste lokaliseringen för orala melanom är gingiva (Todoroff, 1979; Spangler, 2006). Andra lokaliseringar är slemhinna på läpp och kind, hårda och mjuka gommen, tunga, hud, tår och öga (Brodey, 1970; Todoroff, 1979; Hoyt, 1984; Ramos-Vara, 2000; Smith, 2002). Hudmelanom hos hund är vanligen benigna (Modiano, 1999; Sulaimon 2003b).

Orala melanom växer snabbt, är invasiva, återkommer ofta efter kirurgisk behandling och metastaserar via lymf- eller blodkärl till regionala lymfknotor, lungor och viscera (Brodey, 1970; Todoroff, 1979; MacEwen, 1999; Modiano, 1999; Ramos-Vara, 2000; Smith, 2002; Sulaimon, 2003a). Maligna melanom kan även invadera benvävnad och orsaka osteolys (Todoroff, 1979; Smith, 2002).

Orala melanom är vanligast hos hundar som är över tio år gamla (Cotchin, 1955; Brodey, 1970; Todoroff, 1979; Hoyt, 1982; Ramos-Vara, 2000). Störst risk att drabbas löper hundar av småväxta raser samt de med kraftigt pigmenterade munhåleslemhinnor (Cotchin, 1955; Todoroff, 1979; Hoyt, 1984; Ramos-Vara, 2000). I merparten av de studier som gjorts har man sett en större förekomst av malignt melanom hos hanhundar (Cotchin, 1955; Brodey, 1970; Todoroff, 1979; Hoyt, 1984; Ramos-Vara, 2000).

Patogenesen för melanom hos hund är ofullständigt kartlagd (Modiano, 1999; Sulaimon, 2003b). Melanom utvecklas genom att normala melanocyter, isolerade från andra melanocyter, ombildas till pigmenterade, aggregerade neoplastiska melanocyter (Smith, 2002). Detta sker i en flerstegsprocess som börjar med initiering och fortsätter med promotion, transformering och metastasering (Brodland, 1997; Smith, 2002).

Melanom hos hund utvecklas spontant genom interaktion av melaninets gener med miljön (Smith, 2002; Sulaimon, 2003b). Hos domesticerade djur har man sett att vissa stammar (breeds) och familjer utvecklar specifika typer av cancer vilket tyder på att ärftliga komponenter är av betydelse för utveckling av melanom och dess progression (Modiano, 1999; Smith, 2002).

Symtom vid orala melanom är blödningar från munhåla, smärtor från munnen, lösa tänder, halitosis, salivering, ovilja att tugga, oregelbunden käkkontur eller förtjockning av mandibula, synliga tumörer och lymfadenopati (Hoyt, 1984; Smith, 2002; Ettinger, 2005).

Det kan vara svårt att diagnostisera melanom då de varierar kraftigt vad gäller graden av pigmentering; de kan vara allt från opigmenterade till kraftigt pigmenterade (Cotchin, 1955; Hoyt, 1982; Ramos-Vara, 2000). De kan dessutom anta många olika histologiska och cytologiska utseenden (Cotchin, 1955;

Modiano, 1999; Ramos-Vara, 2000). Melanom kan även variera i storlek men de flesta är mellan 1-3 cm stora (Smith, 2002).

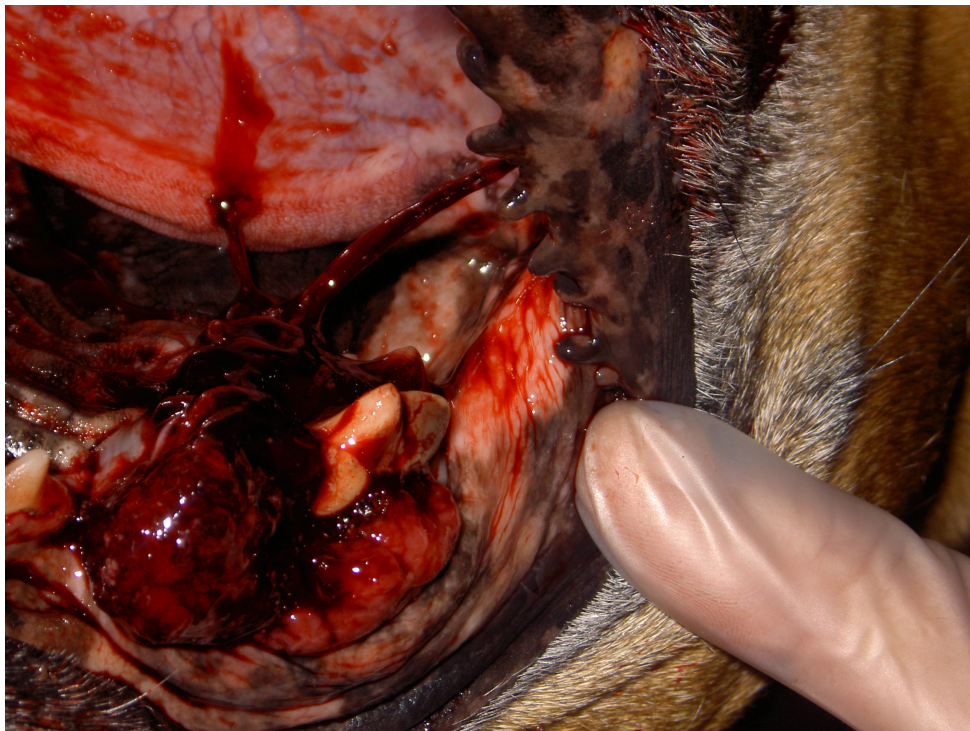
På grund av dessa olikheter måste ofta immunohistokemi användas för att konfirmera diagnosen (Modiano, 1999; Ramos Vara, 2000; Sulaimon, 2002).

Melanomen börjar som en svart macula och utvecklas sedan till en snabbt växande, fast massa. De kan vara kupolformade och jämna eller ha en ulcererad, röd och blödande yta. Mikroskopiskt består melanomen av epiteloida eller spolformade melanocyter (McGavin, 2001).

Det finns ingen enskild effektiv behandling för melanom hos hund (Hoyt, 1984; Modiano, 1999). Terapier som använts för att kontrollera orala neoplasier är, monoterapier eller kombination av olika former av kirurgisk extirpation, strålning, kemoterapi, immunoterapi, genterapi, hypertermi och kryokirurgi (Hoyt, 1984; Modiano, 1999). Standardbehandling vid systemisk kemoterapi är carboplatin (Rassnick, 2001). Malignt melanom hos hund är dock resistent mot kemoterapi och kräver tidig behandling (Hoyt, 1984; MacEwen, 1990; MacEwen, 1999; Bergman, 2003; Sulaimon, 2003a).

Överlevnadstider är mycket korta och de flesta hundar avlivas p.g.a. komplikationer orsakade av metastaser (Todoroff, 1979; Bostock, 1986; MacEwen, 1990; MacEwen, 1999; Catchpole, 2003). Hos hund med framskriden sjukdom är överlevnadstiden efter aggressiv kirurgisk behandling mindre än fem månader (Todoroff, 1979; Ramos-Vara, 2000; Bergman, 2003).

Det finns många likheter mellan malignt melanom hos hund och människa som gör att malignt melanom på hund skulle kunna fungera bra som en klinisk modell för komparativa studier (MacEwen, 1990; Knapp, 1997; Vail, 2000; Smith, 2002; Bergman, 2003). Dessutom är det lättare att få material för forskning från hund än från människa.



*Figur 1. Oralt malignt melanom hos hund.*

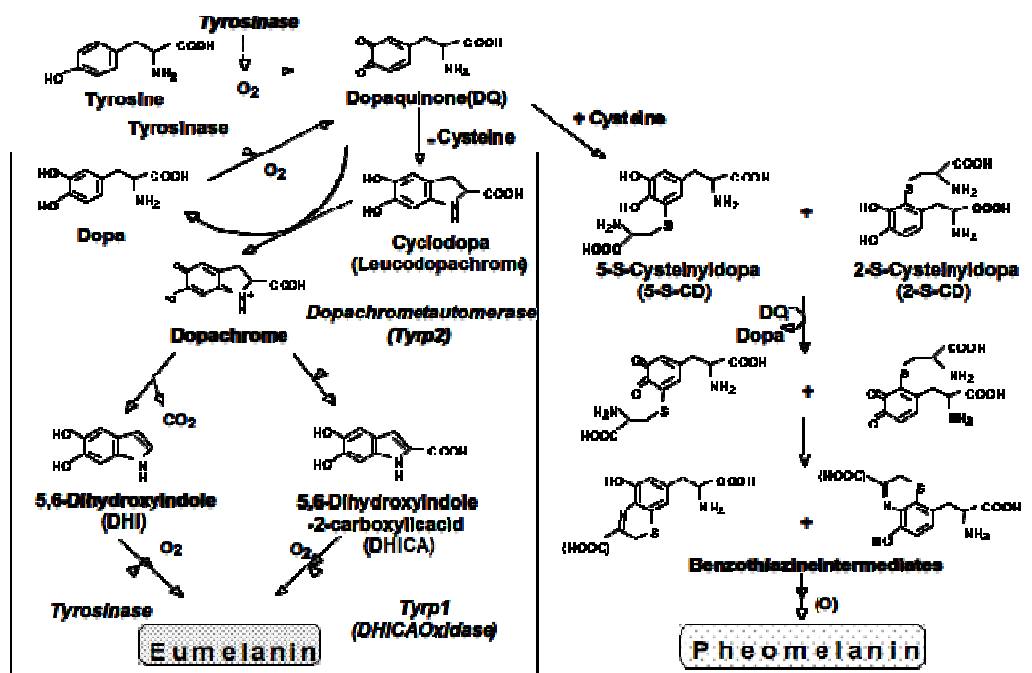


## Melanogenes

Melaninpigment är ett kännemärke för melanom och förekommer ofta i stor mängd i dessa tumörer (Kärnell, 2000).

Melanocyter är melaninbildande dendritiska celler av neuroektodermalt ursprung som finns i hud, hår, ögon, öron, slemhinnor och centrala nervsystemet (Sulaimon, 2003a). I epidermis basallager har de nära kontakt med intilliggande keratinocyter genom sina dendritiska utskott och via dessa utskott överförs melanin till keratinocyterna (Junqueira, 1995; Sulaimon, 2003a). För att skydda melanocyterna från de skadliga intermediärer som bildas under melaninsyntesen sker denna i intracellulära membranbundna organeller, så kallade melanosomer (Junqueira, 1995; Sulaimon, 2003a).

Melaninets exakta struktur är inte känd, men man talar om två slag av pigment, det brun-svarta eumelaninet och det gul-röda feomelaninet (Junqueira, 1995; Kolb, 1997; Sulaimon, 2003a). Aminosyran tyrosinas katalyserar de två första hastighetsbestämmande stegen i syntesen av melaninpigment och melanosomernas innehåll av cystein spelar roll i avgörandet om bildning sker av eumelanin eller feomelanin (Kärnell, 2000; Sulaimon, 2003a). I närvaro av cystein kan cysteinyldopa, den mest välkända intermediära metaboliten i feomelaninsyntesen, bildas (Sulaimon, 2003a).



Figur 2. Melanogenesen.

## Pigmentrelaterade transkript

Maligna melanom är heterogena vad avser biologiska, antigena och metastatiska egenskaper och variationen i genuttryck hos melanomen ökar med progredierande sjukdom. Man har sett att detektionen av tyrosinasttranskript korrelerar med

stadium av sjukdomen (De Vries, 1999). Studier har visat att analys av flera olika markörer utöver tyrosinas skulle kunna öka sensitiviteten vad gäller detektion av melanomceller (Sarantou, 1997; De Vries, 1999; Curry, 1999). De markörer som vi har använt oss av i den kvantitativa RT-PCR-analysen är tyrosinas (TYR), tyrosinasrelaterat protein 1 (TYRP-1) och melanoma antigen recognized by T cells 1 (Melan-A/MART-1).

Melanogenesen styrs av flera enzym, däribland tyrosinas och TYRP-1. Tyrosinas katalyserar de första stegen i melanogenesen. Vilken funktion TYRP-1 har hos hund är inte helt klarlagt ännu men hos möss oxideras en intermediär i eumelaninsyntesen (5,6-dihydroxyindol-2-karboxylsyra) med hjälp av TYRP-1 (Kobayashi, 1994). Melan-A/MART-1 är ett protein utan känd funktion som uttrycks framförallt av melanocyter. Det har identifierats som ett antigen som är specifikt och sensitivt för melanom (Catchpole, 2003).

### **Kvantitativ RT-PCR-analys**

Kvantitativ RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction), är en molekylärbilogisk metod som används för att mäta mängden av ett specifikt mRNA (transkript) i en vävnad eller en grupp av celler. Fördelen med den här tekniken är att den är mycket känslig och i teorin behövs endast en kopia av cDNA för att det ska kunna detekteras.

I ett första steg extraheras RNA fram från vävnaden eller cellkulturen. Med detta RNA som underlag syntetiseras ett komplementärt DNA (cDNA) med hjälp av dNTP (byggstenar) och enzymet omvänt transkriptas (first-strand cDNA-syntes). Detta steg är nödvändigt för att amplifieringen i nästa steg med DNA-polymeras ska kunna fungera.

I nästa steg använder man sig av PCR där det intressanta cDNA't amplifieras med hjälp av ett värmetåligt DNA-polymeras. Man syntetiserar först speciella 17-20 baser långa oligonukleotider (forward respektive reverse primers) vilka är komplementära till vardera strängen av dubbelsträngat DNA i positioner som gör att ett specifikt segment av DNA kan multipliceras (amplifieras). Vid en viss temperatur binder en av oligonukleotiderna sig till cDNA't och när man sedan höjer temperaturen kan DNA-polymeras använda denna oligonukleotid som startsekvens och förlänga den komplementära strängen med cDNA som mall. När man sedan höjer temperaturen ytterligare separeras de två DNA-strängarna och när man därefter åter sänker temperaturen binder oligonukleotiderna till DNA't och så sker ännu en amplifiering, nu med båda primrarna som startsekvenser. Reaktionen sker varv efter varv så att DNA't mellan de två oligonukleotiderna amplifieras i stor mängd.

Speciella fluorescerande molekyler (prober) tillsätts till reaktionsblandningen. Dessa prober, som fluorescerar på olika sätt, binder specifikt till de intressanta DNA-segmenten. Styrkan på de olika fluorescenserna blir högre ju fler av det motsvarande transkriptet som finns och den flouescenssignal som ökar tidigast indikerar det transkript som det finns störst mängd av. (Brown, 2001; Brändén, 2003; Newton, 1994)

## Syfte

Syftet med den här studien är att se om man kan använda kvantitativ RT-PCR för att detektera pigmentrelaterade transkript i hårrötter från hund. Målet är sedan att utveckla metoden för att kunna analysera dessa markörer i tumör-, lymfvävnad och blod. Denna metod borde då kunna användas för att detektera melanom, avgöra i vilket stadium av sjukdomen malignt melanom en patient befinner sig och även följa terapieffekt hos både hund och människa.

## MATERIAL OCH METOD

Materialet utgjordes av 30 hårstrån från vardera 18 hundar med olika pälsfärg. Vi har inte tagit hänsyn till hundarnas härkomst, kön eller ålder då de pigmentrelaterade transkripten ser likadana ut oberoende av dessa faktorer. Håren rycktes med rötterna och hårrötterna klipptes sedan ner i RNA-later buffert för att nedbrytningen av mRNA skulle upphöra. Proverna förvarades i  $-70^{\circ}\text{C}$  i väntan på analys som skedde inom tre veckor på avdelningen för klinisk kemi vid Linköpings universitetssjukhus. Studien är godkänd av försöksdjursetisk nämnd.

### Homogenisering och RNA-extraktion

Homogenisering av hårrötterna gjordes med Mikro-Dismembrator S (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Germany) vid 3000 rpm under 1 minut. RNA (total-RNA) extraherades med QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) och eluerades i 40  $\mu\text{L}$  RNAs-fritt vatten. Eftersom startmaterialet utgjordes av hårrötter och inte blod uteslöts lyseringssteget för erytrocyter.

### Primrar och prober

I tabellen 1 finna sekvenserna för de primrar och prober som användes vid RT-PCR. Dessa gjordes med människans sekvenser som förlaga då hundens och människans genom till stor del liknar varandra. Vad gäller MLANA (Melan-A/MART-1) fick vi designa nya primrar och prober då det visade sig att nukleotidsekvensen hos dessa skilde sig markant mellan människa och hund.

Tabell 1. Sekvenser för de primrar och prober som användes vid RT-PCR

Primrar och prober	Sekvenser
<b>TYR:</b> Hund lokus nr. AY336053	
FP	ATGGATAAAGCTGCCAATTTC
RP	GGCATCTGCTATCCCAGTA
Probe	CTTTAGAAATACACTGGAAGGATTTGCTAGTCCAC
<b>TYRP1:</b> Hund lokus nr. AY052751	
FP	TCATGAAGGACCAGCTTTTC
RP	TCCTGCAACATTTCTGCAT
Probe	CACATGGCACAGATACCACCTACT
<b>MLANA:</b> Hund lokus nr. AY251268	
FP	AAGGGGCATAACCACTCCTACA
RP	ATTCCCAGGATCACTGTCAAGA
Probe	TCCAATCCCTGCAGCCTCTTCAGCT

### **First-strand cDNA-syntes**

RNA (17.5 µL) denaturerades vid 70°C under 5 minuter och placerades sedan på is. Till RNA't sattes 17.5 µL cDNA-reagensblandning. De slutliga koncentrationerna var: 1 x First Strand Buffer (Life Technologies), 7.5 mM/L dithiothreitol (Life Technologies), 50 µmol/L random hexamer (Pharmacia Biotech), 500 µmol/L dNTP (Pharmacia Biotech),  $1 \times 10^6$  U/L RNAsin (Promega) och  $1 \times 10^6$  U/L murine Moloney leukemia virus reverse transcriptase (Life Technologies). First-strand cDNA-syntes utfördes vid 40 °C under 45 minuter och reaktionen hettades sedan upp till 95°C under 5 minuter.

### **PCR**

Transkripten analyserades enligt tidigare PCR-protokoll beskrivna i: Johansson, 2000; Johansson, 2002. De slutliga reagentkoncentrationerna var: 1 x TaqMan PCR Buffer (Applied Biosystems, CA), 5 mM MgCl<sub>2</sub> (Applied biosystems), 200 µM dNTP (Pharmacia Biotech), 100 nM forward primer, 100 nM reverse primer, 50 nM probe och 0,025 U/µL AmpliTaq Gold (Applied Biosystems). Varje prov analyserades som triplikat med hjälp av ABI Prism 96-well Optical Reaction Plate (Applied Biosystems, CA). PCR-profilen som användes var 95°C under 10 min följt av 40 cykler av 15 s vid 95°C och 1 min vid 60°C.

### **RESULTAT**

Resultaten av transkriptanalyserna framgår av tabell 2. De svarta hundarnas hårrötter innehåller över lag större mängd av de olika transkripten än de vita, gula och bruna hundarnas vilka innehåller mycket lite eller inga pigmentrelaterade transkript.

Tabell 2. Innehåll av de olika pigmentrelaterade transkripten i hårproverna

Num- mer	Ras	TYR tr/μl cDNA	TYRP-1 tr/μl cDNA	MLANA tr/μl cDNA
8	Vita hår från Berner sennen	0	0	3
7	Vit Bichon frisé	0	0	4
17	Vit Samojed	0	4	83
4	Vit West highland white terrier	0	2	6
12	Vit West highland white terrier	3	24	87
13	Gul Golden retriever	0	1	2
14	Gul Golden retriever	0	0	8
19	Gul Golden retriever	0	3	2
1	Brun Setter	0	0	22
10	Bruna hår från Berner sennen	0	0	1
2	Mörkbrun Flatcoated retriever	2	6	46
9	Svarta hår från Berner sennen	0	17	7
15	Svart Labrador retriever	222	19133	3161
6	Svart Lagotto romagnolo	1	36	24
5	Svart New foundland	602	47597	7226
3	Svart Pudel	9	358	147
11	Svart Pudel	364	27977	6003
16	Svart Schnauzer	371	24746	3195
18	Svart Schnauzer	1276	63919	9011
20	Svart	2	129	26
21	Negativ kontroll	0	0	0

## DISKUSSION

I denna studie använde vi oss av en kvantitativ RT-PCR-metod för att mäta tre olika pigmentrelaterade transkript (TYR, TYRP-1, Melan-A/MART1) i hårrötter från hundar med olika pälsfärg och av olika ras. Som förväntat hade hundar med svart päls höga halter av transkripten jämfört med vita hundar. Det finns dock tre svarta hundar som har mycket liten mängd tyrosinas. Anledningen till detta vet vi inte. Vita hundar har inget pigment i hårstrået och saknar de transkript som behövs för att syntetisera melanin. Svarta hundar har uppenbarligen de transkript som behövs för att bilda pigment och även om vi inte i denna studie har analyserat pigmenten i sig så förutsätter vi att dessa hundar producerar det svarta eumelaninet. Däremot hade vi förväntat oss att de gula och bruna hundarna skulle ha högre halter av transkripten än vita hundar. Vår tanke var att gula och bruna hundar skulle syntetisera feomelanin analogt med att hårfärgen hos rödhåriga personer uppkommer genom att dessa personer har feomelanin i sitt hår (Borges, 2001). Både feomelanin och eumelanin bildas med hjälp av enzymet tyrosinas (Figur 2). Hundarna 13, 14 och 19 (Golden retriever) hade inga påvisbara tyrosinas-transkript och även den mörkbruna flatcoated retrievern hade knappt påvisbart tyrosinas-mRNA. Detsamma gäller för de andra två bruna hundarna (nr

1 och nr 10). Vi konstaterar också att de övriga två transkripten TRP1 och MLANA i stort följer samma mönster som tyrosinas. Den slutsats som vi drar av våra resultat är att mekanismen för hårstråets färgbildning skiljer sig åt mellan människa och de gula och bruna hundarna. Vi drar även slutsatsen att de gula och bruna hundarna inte har feomelanin i sina hårstrån. För att belägga detta med säkerhet behöver man dock mäta pigmentinnehållet i det färdiga håret. Därför har jag samlat in hårprover från gula och svarta labradorer samt irländska settrar men de analyserna är inte färdiga ännu.

Innan man går vidare och tar fram en metod för att analysera pigmentrelaterade transkript i blod, tumör- och lymfvävnad bör man först optimera metoden för att detektera dessa i hårrötter från hund då det materialet är lättare att få tag på. I nuläget är denna analysmetod för dyr för att användas men när utvecklingen går framåt och kostnaderna för att genomföra dessa analyser minskar så finns tekniken utprovad. Man söker hela tiden efter nya tekniker som gör att man kan upptäcka så små tumörer som möjligt för att kunna behandla patienter med malignt melanom så effektivt som möjligt och då skulle den här metoden kunna vara användbar. Att preoperativt kunna avgöra i vilket stadium en patient befinner sig skulle förbättra valet av terapi och förhindra lidande i form av onödigt stora postoperativa trauman.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Bergman, P.J., McKnight, J., Novosad, A., Charney, S., Farrelly, J., Craft, D., Wulderk, M., Jeffers, Y., Sadelain, M., Hohenhaus, A.E., Segal, N., Gregor, P., Engelhorn, M., Riviere, I., Houghton, A.N., Wolchok, J.D. (2003). "Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial". *Clin Cancer Res* 9(4):1284-90.
- Borges, C.R., Roberts, J.C., Wilkins, D.G., Rollins, D.E. (2001). "Relationship of melanin degradation products to actual melanin content: application to human hair". *Anal Biochem* 290(1):116-25.
- Bostock, D.E. (1986). "Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats". *Br Vet J* 142(1):1-19.
- Brodey, R.S. (1970). "The biological behaviour of canine oral and pharyngeal neoplasms". *J Small Anim Pract* 11(1):45-53
- Brodland, D.G. (1997). "The life of a skin cancer". *Mayo Clin Proc* 72(5):475-8.
- Brown, T.A. (2001). "Gene cloning and DNA analysis. An introduction". Blackwell Science. S. 179-193, 224
- Brändén, H. (2003). "Molekylär biologi". Studentlitteratur. S. 204-207.
- Catchpole, B., Gould, S.M., Kellett-Gregory, L.M., Dobson, J.M. (2003). "Development of a multiple-marker polymerase chain reaction assay for detection of metastatic melanoma in lymph node aspirates of dogs". *Am J Vet Res* 64(5):544-9.
- Cotchin, E. (1955). "Melanotic tumours of dogs". *J Comp Pathol* 65(2):115-29
- Curry, B.J., Myers, K., Hersey, P. (1999). "MART-1 is expressed less frequently on circulating melanoma cells in patients who develop distant compared with locoregional metastases". *J Clin Oncol* 17(8):2562-71.
- De Vries, T.J., Fourkour, A., Punt, C.J., van de Locht L.T., Wobbles, T., van den Bosch, S., de Rooij, M.J., Mensink, E.J., Ruiter, D.J., van Muijen, G.N. (1999). "Reproducibility of detection of tyrosinase and MART-1 transcripts in the peripheral blood of melanoma patients: a quality control study using real-time quantitative RT-PCR". *Br J Cancer* 80(5-6):883-91.
- Ettinger, S.J., Feldman, E.C. (2005). "Textbook of veterinary internal medicine". 6th ed. Elsevier Saunders. S. 1291-1293.
- Hoyt, R.F., Withrow, S.J. (1984). "Oral malignancy in the dog". *J Am Anim Hosp Assoc* 20(1):83-92
- Johansson, M., Pisa, E.K., Törmänen, V., Årstrand K., Kågedal, B. (2000). "Quantitative analysis of tyrosinase transcripts in blood". *Clin Chem* 46(7):921-927
- Johansson, M., Takasaki, A., Lenner, L., Årstrand K., Kågedal, B. (2002). "Quantitative relationships between pigment-related mRNA and biochemical melanoma markers in melanoma cell lines" *Melanoma Res* 12(3):193-200
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O. (1995). "Basic Histology" 2nd ed. McGraw-Hill. S. 350-352.
- Knapp, D.W., Waters, D.J. (1997). "Naturally occurring cancer in pet dogs: important models for developing improved cancer therapy for humans". *Mol Med Today* 3(1):8-11.
- Kobayashi, T., Urabe, K., Winder, A., Jiménez-Cervantes, C., Imokawa, G., Brewington, T., Solano, F., García-Borrón, J.C., Hearing, V.J. (1994). "Tyrosinase related protein

- 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis". *EMBO J* 13(24):5818-25.
- Koenig, A., Wojcieszyn, J., Weeks, B.R., Modiano, J.F. (2001). "Expression of S100a, vimentin, NSE, and melan A/MART-1 in seven canine melanoma cells lines and twenty-nine retrospective cases of canine melanoma". *Vet Pathol* 38(4):427-35.
- Kolb, A.M., Lentjes, E.G., Smit, N.P., Schothorst, A., Vermeer, B.J., Pavel, S. (1997). "Determination of pheomelanin by measurement of aminohydroxyphenylalanine isomers with high-performance liquid chromatography". *Anal biochem* 252(2):293-8.
- Kärnell, R., Kågedal, B., Lindholm, C., Nilsson, B., Årstrand, K., Ringborg, U. (2000). "The value of cysteinyl-dopa in the follow-up of disseminated malignant melanoma". *Melanoma Res* 10(4):363-9.
- MacEwen, E.G. (1990). "Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment". *Cancer Metastasis Rev* 9(2):125-36.
- MacEwen, E.G., Kurzman, I.D., Vail, D.M., Dubielzig, R.R., Everlith, K., Madewell, B.R., Rodriguez, C.O. Jr., Phillips, B., Zwahlen, C.H., Obradovich, J., Rosenthal, R.C., Fox, L.E., Rosenberg, M., Henry, C., Fidel, J. (1999). "Adjuvant therapy for melanoma in dogs: results of randomized clinical trials using surgery, liposome-encapsulated muramyl tripeptide, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor". *Clin Cancer Res* 5(12):4249-58.
- Newton, C.R., Graham, A. (1994). "PCR". Bios Scientific Publishers.
- Ohashi, E., Inoue, K., Kagechika, H., Hong, S.H., Nakagawa, T., Takahashi, T., Mochizuki, M., Nishimura, R., Sasaki, N. (2002). "Effect of natural and synthetic retinoids on the proliferation and differentiation of three canine melanoma cell lines". *J Vet Med Sci* 64(2):169-72.
- Ramos-Vara, J.A., Beissenherz, M.E., Miller, M.A., Johnson, G.C., Pace, L.W., Fard, A., Kottler, S.J. (2000). "Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases". *Vet Pathol* 37(6):597-608.
- Rassnick, K.M., Ruslander, D.M., Cotter, S.M., Al-Sarraf, R., Bruyette, D.S., Gamblin, R.M., Meleo, K.A., Moore, A.S. (2001). "Use of carboplatin for treatment of dogs with malignant melanoma: 27 cases (1989-2000)". *J Am Vet Med Assoc* 218(9):1444-8.
- Sarantou, T., Chi, D.D., Garrison, D.A., Conrad, A.J., Schmid, P., Morton, D.L., Hoon, D.S. (1997). "Melanoma-associated antigens as messenger RNA detection markers for melanoma". *Cancer Res* 57(7):1371-6.
- Smith, S.H., Goldschmidt, M.H., McManus, P.M. (2002). "A comparative review of melanocytic neoplasms". *Vet Pathol* 39(6):651-78.
- Spangler, W.L., Kass, P.H. (2006). "The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia". *Vet Pathol* 43(2):136-49.
- Sulaimon, S., Kitchell, B., Ehrhart, E. (2002) "Immunohistochemical detection of melanoma-specific antigens in spontaneous canine melanoma". *J Comp Pathol* 127(2-3):162-8.
- Sulaimon, S.S., Kitchell, B.E. (2003a). "The biology of melanocytes". *Vet Dermatol* 14(2):57-65.
- Sulaimon, S.S., Kitchell, B.E. (2003b). "The basic biology of malignant melanoma: molecular mechanisms of disease progression and comparative aspects". *J Vet Intern Med* 17(6):760-72.



- McGavin, M.D., Carlton, W.W., Zachary, J.F. (2001). "Thomson's special veterinary pathology 3rd edition. Mosby, Inc. S. 8
- Todoroff R.J., Brodey R.S. (1979). "Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: a retrospective survey of 361 cases". J Am Vet Med Assoc 175(6):567-71.
- Vail, D.M., MacEwen, E.G. (2000). "Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer". Cancer Invest 18(8):781-92.